

N-氨甲酰氨基酸水解酶在毕赤酵母中的表达

张惟材^{2*} 李迎丽^{1,2} 张彦明¹ 邓兵兵² 黄留玉²

(西北农林科技大学 杨凌 712100)¹ (军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)²

摘要: N-氨甲酰氨基酸水解酶是乙内酰胺酶系的组成部分, 催化 N-氨甲酰氨基酸水解为相应氨基酸。节杆菌 BT801 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶是该菌乙内酰胺酶系中惟一具立体专一性的酶, 也是整个反应体系的限速酶。通过 PCR 从携带乙内酰胺酶系完整操纵子的亚克隆质粒 pUC18-169 上扩增得到 N-氨甲酰氨基酸水解酶基因 (*hyuC*) 片段, 连接到载体 pPIC3.5K 上, 经 *Bgl*II 酶切线性化, 通过 PEG 法转化导入毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 利用 G418 抗性筛选得到插入多拷贝目的基因的转化子。酶活性分析表明所得转化子具有 N-氨甲酰氨基酸水解酶活性, 可将 N-氨甲酰基苯丙氨酸水解为苯丙氨酸。

关键词: N-氨甲酰氨基酸水解酶, 巴斯德毕赤酵母, 基因表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0073-04

EXPRESSION OF L-N-CARBAMOYLASE GENE IN *PICHA PASTORIS*

ZHANG Wei-Cai^{2*} LI Ying-Li^{1,2} ZHANG Yan-Ming¹ DENG Bing-Bing² HUANG Liu-Yu²

(Northwest Science and Technology of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)¹

(Institute of Biotechnology, Beijing 100071)²

Abstract: N-carbamoylase is a part of hydantoinase operon which can transform N-carbamoylamino acid to corresponding amino acids. The L-N-carbamoylase of *Arthrobacter* BT801, coded by the *HyuC* gene, is the rate-limiting and the only stereoselective enzyme. *HyuC* DNA fragment was amplified by PCR from the plasmid of pUC18-169. The target fragment was introduced into pPIC3.5K plasmid to construct the pPIC3.5K-*hyuC* expressing vector which was then transduced into *Pichia pastoris* GS115 cells after being linearized by *Bgl*II digestion. Multi-copies insertion transformants were screened on G418 plates. The recombinant protein was proved to have biological activity of hydrolyzing N-carbamoylphenylalanine into phenylalanine through enzyme activity determination.

Key words: L-N-Carbamoylase, *Pichia pastoris*, Gene expression

乙内酰胺酶是催化乙内酰胺类衍生物开环水解的一类酶。从广义上讲, 乙内酰胺酶系由 3 种酶组成, 包括乙内酰胺消旋酶 (Hydantoin racemase, 酶 I)、乙内酰胺水解酶 (Hydantoin hydrolase, 酶 II) 和 N-氨甲酰氨基酸水解酶 (N-Carbamoylase, 酶 III)。编码上述 3 种酶的基因常组成一个乙内酰胺酶操纵子, 称为乙内酰胺利用操纵子 (Hydantoin utility operon)。在这 3 种酶的协同作用下, 5-位单取代乙内酰胺类化合物能够被转化为相应的各种氨基酸, 因而被广泛用于各种氨基酸的酶法生产。乙内酰胺酶在自然界中分布广泛, 在动植物和微生物中均有发现, 而在氨基酸酶法生产中均是采用微生物来源的乙内酰胺酶^[1]。*Arthrobacter* BT801 是本室筛选得到的一株 L-乙内酰胺酶产生菌, 该菌可将 DL-5-苄基乙内酰胺特异水解为 L-苯丙氨酸。我们构建了 *Arthrobacter* BT801 基因文库, 并从中分离得到了包含完整乙内酰胺酶操纵子的全长序列^[2]。研究表明, 在组成该乙内酰胺酶系的 3 个酶中, 只有 N-氨甲酰氨基酸水解酶具有立体选择性, 决定着终产物的立体构型, 同时还发现该酶催化的水解反应也是整个反应的限速步骤。N-氨甲酰氨基酸水解酶的高表达对于该酶的基础研究和提高生物转化的速度及效率都

* 联系人 E-mail: zhangweicai@hotmail.com.

收稿日期: 2003-01-05, 修回日期: 2003-03-20

具有重要意义。巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是 Invitrogen 公司开发的一种新型真核表达系统, 具有自身分泌蛋白少、表达量高、易于培养等优点^[3], 本文采用该系统进行了 N-氨甲酰氨基酸水解酶表达的尝试。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌种和质粒: 巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) GS115 ($his^4 Mut^+$) 和表达质粒 pPIC3.5K 均为 Invitrogen 公司产品, 大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, 含乙内酰脲酶操纵子的亚克隆质粒 pUC18-169 由本室构建。

1.1.2 主要试剂: 所有分子克隆用酶均购自大连宝生物公司, YNB 为 Difco 公司产品。G418、生物素为 Sigma 公司产品, N-氨甲酰基苯丙氨酸 (N-CP) 为本室化学合成, 其他均为分析纯化学试剂。质粒提取和 DNA 纯化试剂盒均为 Promega 公司产品。底物悬液: 将 1g 底物 (N-CP) 溶于 2mol/L NaOH, 用 2mol/L HCl 中和至 pH7.0, 再加 $CoCl_2$ 6.5mg, 十六烷基三甲基溴化铵 10mg, 溶解后定容至 100mL。茚三酮试剂: 按文献[4]配制。

1.1.3 培养基: MM (Minimal Methanol) 固体培养基: YNB 13.4 g, 生物素 40 μ g, 甲醇 5 mL, 琼脂粉 15g, 定容至 1 L; MD (Minimal Dextrose Medium) 固体培养基: 用 20g 葡萄糖代替 MM 中的 5mL 甲醇; YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium): 酵母提取物 10g, 蛋白胨 20g, 葡萄糖 20g, 定容至 1 L; BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium): 酵母提取物 10g, 蛋白胨 20g, YNB 13.4g, 生物素 40 μ g, 甘油 10mL, 1mol/L pH6.0 磷酸钾缓冲液 100mL, 定容至 1 L。

1.1.4 引物合成: 由上海博亚公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 常规操作: 有关 *P. pastoris* 的实验方法参照 Invitrogen 公司的 *Pichia Expression Kit* 操作手册进行。常规分子生物学操作参照分子克隆^[5]。

1.2.2 酶活的定性检测: 取 0.1 mL 培养物, 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 1 次, 重悬于 0.1 mL 0.5% N-CP 底物悬液, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 12,000 r/min 离心 1min, 上清液在硅胶 G 薄层板上展开, 展开剂为正丁醇-乙酸-水 = 4:1:1, 用 0.3% 茚三酮显色, 产酶菌体转化产物在苯丙氨酸位置有紫红色斑点。

1.2.3 酶活力的定量测定: 12 000 r/min 离心收集 2mL 培养物, 用生理盐水和 pH 7.0, 0.1mol/L Tris-HCl 各洗涤 1 次, 重悬于 1 mL pH 7.0, 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, 加 1mL 0.5% N-CP 底物悬液, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h, 立即加入 0.5 mL 12% 三氯乙酸终止反应, 离心, 测定法在 570nm 处吸光度, 确定苯丙氨酸含量。以在上述条件下 1h 内生成 1mg 苯丙氨酸的酶量定义为 1 个活力单位 (U)。

1.2.4 氨基酸的比色测定: 参照文献[4]进行。在试管中加 0.2mL 样品及 0.4 mL 茚三酮试剂, 沸水浴 15 min, 迅速冷却后加入 50% 乙醇 4.4 mL, 混匀, 于 570 nm 处测定吸光度, 从以 L-苯丙氨酸标准品绘制的标准曲线上计算转化产物苯丙氨酸的含量。

1.2.5 蛋白含量测定: 按 Lowry 法进行^[6]。

2 结 果

2.1 重组质粒 pPIC3.5K-hyuC 的构建

根据亚克隆质粒 pUC18-169 上 *hyuC* 基因序列, 设计并合成了如下一对 PCR 引物, 上游引物 PHC1 为 ACC ATG ACG TCG CTT AGA GCA CAA GC, 下游引物 PHC2 为 ATT

TGC GGC CGC TCA CTT ATC GAG CGC CGT CA, 其中引入了 *Not* I 酶切位点。PCR 反应参数为: 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 70s, 重复 30 个循环后 72°C 继续延伸 5min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将质粒 pPIC3.5K 用限制性内切酶 *Bam*HI 酶切, T4 DNA 聚合酶使 3' 末端平滑化, 再用 *Not* I 酶切, 纯化酶切片; 以质粒 pUC18-169 为模板, 以 PHC1 和 PHC2 为上下游引物, PCR 扩增出长度为 1240bp 的 *hyu*C 基因, 纯化 PCR 产物后用 T4 DNA 聚合酶将末端平滑化, 再用 *Not* I 酶切, 得到目的基因片段。连接上述两片段, 构建成重组酵母表达质粒, 结构如图 1。

2.2 重组质粒 pPIC3.5K-*hyu*C 的酶切及 PCR 鉴定

提取质粒 pPIC3.5K-*hyu*C, 用 *Not* I 酶切, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在 10 Kb 处有一电泳带 (图 2), 与预期的质粒大小 (10.2kb) 相符。另以质粒 pPIC3.5K-*hyu*C 为模板, PHC1 和 PHC2 为引物, PCR 扩增, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果在 1.2 kb 处有一特异扩增条带, 与预期结果一致 (图 3)。表明重组质粒构建正确。

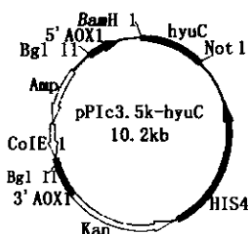


图 1 表达质粒 pPIC3.5K-*hyu*C 的结构图

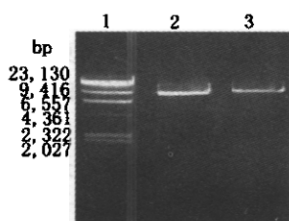


图 2 重组质粒的酶切鉴定

1 λ -*Hind*III Marker, 2 pPIC3.5K/*Not*I,
3 pPIC3.5K-*hyu*C/*Not*I

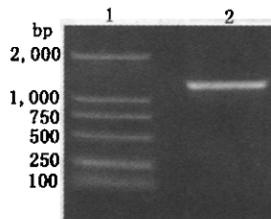


图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

1 DL 2000 Marker, 2 PCR products

2.3 酵母细胞的转化和 G418 抗性转化子筛选

用 *Bgl*II 酶切重组酵母表达载体 pPIC3.5K-*hyu*C 使线性化, 用 PEG 法转化 GS115 感受态细胞, 在含 G418 的 MD (Minimal Dextrose Medium) 平板上培养 72h, 长出 *his*⁺ 菌落。再用不同浓度 G418 的平板筛选得到 12 个插入多拷贝外源基因的转化子。

2.4 转化子甲醇利用型的鉴定

挑取 MD 平板上长出的转化子, 同时在 MM 和 MD 平板上划线, 30°C 培养 48h。结果只在 MD 平板上生长正常, 而在 MM 平板上生长缓慢或不生长的菌株 (即甲醇利用缓慢型, *his*⁺ Mut^{*}) 约占 20%。

2.5 重组蛋白的诱导表达和阳性菌株的薄层层析筛选

挑取鉴定正确转化子的单菌落接种于 5mL YPD 液体培养基中, 30°C, 250r/min 培养至 $OD_{600} = 2 \sim 6$, 再吸取 300 μ L 菌液接种于 30mL BMGY 液体培养基, 30°C 培养至 OD_{600} 为 15~20 时加入甲醇至终浓度为 0.5%, 以后每隔 12h 再补加一次甲醇, 于诱导后 0、12、24、48、60、72h 分别取样。离心收集 1mL 经甲醇诱导 72h 后的菌体, 加底物悬液于 37°C 反应 1h, 离心, 用薄层层析法检测上清液中的转化产物苯丙氨酸, 结果见图 4, 在含 G418 的 MD 平板上挑取 10 个转化子, 其中有 2 个活性较强的转化子。将其中 7 号重组子命名为 GS115/pPIC3.5k-*hyu*C。

2.6 转化产物分析

用氨基酸自动分析仪对转化产物进行了氨基酸组成分析, 结果见图 5。从图中结果看到, 转化产物中主要成分为苯丙氨酸和 NH_3 , 而其他杂质甚微。其中苯丙氨酸为预期

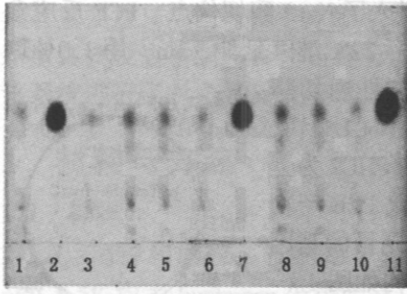


图4 阳性转化子的筛选
1-10 transformants, 11 L-phe

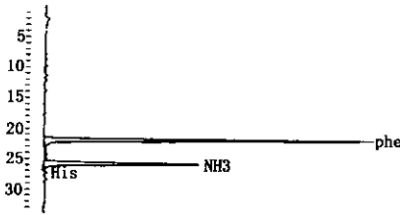


图5 转化产物的氨基酸分析

的水解产物, NH₃ 是由水解酶切下底物的氨甲酰基团进一步分解形成的, 是预期的转化副产物。而不含 *HyuC* 基因菌体的对照组中没有上述产物(结果未显示), 提示 *HyuC* 基因在毕赤酵母中得到表达, 表达产物具有生物学功能。

2.7 重组菌株 N-氨甲酰氨基酸水解酶活力测定

以 N-CP 为底物分别测定了节杆菌 BT801、DH5 α /pUC18-169 和 GS115/pPIC3.5k-*hyuC* 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶活力, 结果分别为 0.668U/mg、0.701U/mg、1.512U/mg。可以看出, GS115/pPIC3.5k-*hyuC* 的 N-氨甲酰氨基酸水解酶的比活力分别是出发菌株 BT801 和亚克隆 DH5 α /pUC18-169 的 2.26 和 2.15 倍。

3 讨论

有关 D-乙内酰胺酶 *HyuC* 基因克隆和表达的研究很多, 但关于 L-乙内酰胺酶的研究还不多, 目前已有报道的是德国斯图加特大学 Syl-

datk 实验室有关节杆菌 L-乙内酰胺酶菌株及基因分离等工作^[7]。毕赤酵母表达系统是近年来发展起来的一种新型真核表达系统, 具有许多优点: 有强的 AOX1 启动子, 可严格调控外源基因的表达; 蛋白表达量高; 表达的蛋白具有天然的生物学活性; 获得的重组酵母菌株十分稳定等^[8]。在本实验中我们选择毕赤酵母表达系统进行了 N-氨甲酰氨基酸水解酶表达的尝试。实验结果表明这一完整的原核基因在毕赤酵母中得到了表达, 且表达产物具有生物学活性。获得的重组菌株在没有选择压力的条件下连续多次传代, 其 his⁺ Mut^S 表型和目的基因表达未发生任何改变。Guarna 等发现按照 Invitrogen 提供的甲醇添加速度(每 24h 添加一次甲醇, 浓度为 0.5%), 甲醇将在 10h 之内耗完, 其后的 14h 内菌体都处于甲醇饥饿状态^[9]。因此我们在诱导时, 采用了每 12h 添加一次甲醇的方式, 每次添加的浓度为 0.5%。经甲醇诱导所得菌体的酶活性明显高于未经诱导的菌体, 实际上后者没有检测到酶 III 的活性, 表明毕赤酵母表达载体的醇氧化酶基因(AOX1)是一种可严格调控的强启动子。我们对 BT801 N-氨甲酰氨基酸水解酶的基因进行了密码子使用频率分析, 发现其中精氨酸(CGC、CGA、CGG)、脯氨酸(CCG)、亮氨酸(ATA)、甘氨酸(GGG)等使用了较多毕赤酵母的稀有密码子^[10], 可能影响到 *hyuC* 的表达。对上述稀有密码子进行替换、进一步筛选高拷贝插入外源基因菌株以及优化诱导表达的条件, 可望实现 *hyuC* 基因更高水平的表达。

参考文献

[1] 张惟材. 生物技术通讯, 1999, 10 (2): 141~144.
 [2] 郝淑凤, 张惟材, 袁红杰, 等. 生物工程学报. 2003, 19 (3): 281~285.
 [3] 欧阳立明, 张惠展, 张嗣良. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (2): 151~154.
 [4] Moore S, Stein W H. J Biol Chem. 1948, 176: 367~388.
 [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
 [6] Lowry O I, Rosebrough N J, Farr A L, et al. J Biol Chem, 1951, 193 (1): 265~276.
 [7] Wilms B, Wiese A, Syladatk C. et al. J Biotechnol, 1999, 68: 101~113.
 [8] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Bio Technology, 1993, 11: 905~910.
 [9] Guarna M M, Cote H C, Amandoron E A, et al. Ann N Y Acad Sci, 1996, 799: 397~400.
 [10] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 生物工程学报, 2000, 16 (3): 308~311.